

## BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	15 DEC 1999
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

EP 99 / 7094

Die Trion Pharma GmbH in München/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Bispezifische und trispezifische Antikörper, die spezifisch mit induzierbaren Oberflächenantigenen als operationelle Zielstrukturen reagieren“

am 25. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Hoiß

A ktenzeichen: 198 44 157.6

DR. ERNST STURM (1951-1980)  
DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD  
DIPL.-ING. UDO SKUHRA  
DIPL.-ING. REINHARD WEISE  
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH  
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER\*  
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH

FRIEDRICHSTR. 31  
D-80801 MÜNCHEN

POSTF. / P.O. BOX 440151  
D-80750 MÜNCHEN

\*MOHRENSTR. 20  
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P10508  
Dr.B/La

24. September 1998

Anmelder: Trion Pharma GmbH  
Frankfurter Ring 193a  
80807 München

Bispezifische und trispezifische Antikörper, die spezifisch mit induzierbaren Oberflächenantigenen als operationelle Zielstrukturen reagieren

Die vorliegende Erfindung betrifft neue bispezifische und trispezifische Antikörper, Verfahren zur Herstellung dieser Antikörper sowie ihre Verwendung in der Immuntherapie.

Die Immuntherapie durch Antikörper, insbesondere durch bispezifische oder trispezifische Antikörper, hat in den letzten Jahren an Bedeutung stetig zugenommen. Ein wesentliches Problem bei der Verwendung derartiger Antikörper in der Immuntherapie ist die spezifische Erkennung der Zielzelle durch die Antikörper, d.h. eine möglichst genaue Differenzierung zu den Zellen, die durch die Antikörper nicht angegriffen werden sollen, d.h. den Zellen im normalen, physiologischen Zustand. Je spezifischer die Erkennung von Zielstrukturen auf den Zielzellen durch

die Antikörper ist, desto schonender verläuft eine Therapie mit derartigen Antikörpern für einen Patienten und desto geringer sind die Nebenwirkungen.

Die Lösung diese Problems wird umso wichtiger, je stärker die Effizienz von Immuntherapien mit der Möglichkeit starker Nebenwirkungen zunimmt.

In der DE 196 49 223 und der DE 197 10 495 sind intakte bispezifische und trispezifische Antikörper beschrieben, die zur Immuntherapie eingesetzt werden. Diese bispezifischen und trispezifischen Antikörper sind befähigt, an eine T-Zelle, zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle und durch ihren Fc-Teil oder durch eine dritte Spezifität an Fc-Rezeptor positive Zellen (akzessorische Zellen) zu binden.

Während beispielsweise monoklonale Antikörper bei ihrer Anwendung in der Immuntherapie nur bestimmte, klar umgrenzte Teilbereiche des Immunsystems an einer Zielzelle aktivieren und deshalb die bei einem Patienten auftretenden Nebenwirkungen ebenfalls begrenzt und deshalb relativ leicht zu kontrollieren sind, rufen intakte bispezifische und trispezifische Antikörper wesentlich stärkere Nebenwirkungen hervor, wenn die Spezifität des Bindungsarmes, der ein Antigen auf einer Zielzelle erkennt, gering ist. Der Grund liegt darin, daß intakte bispezifische und trispezifische Antikörper nicht nur T-Zellen aktivieren, sondern gleichzeitig auch akzessorische Zellen, beispielsweise Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Diese Nebenwirkungen könnten dadurch verringert werden, daß eine hochspezifische Erkennung der Zielzelle durch den Antikörper ermöglicht wird.

Es ist somit eine wichtige Aufgabe der vorliegenden Erfindung, intakte bispezifische und trispezifische Antikörper bereitzustellen, die hochspezifisch ein Antigen auf einer Zielzelle erkennen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper gelöst, die zumindest die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
- c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und der hierdurch eine Immunantwort induziert und/oder die Zielzellen zerstört, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle nicht ausreicht.

Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, daß nach Induktion bereits eine relativ geringe Anzahl der Zielantigene auf der Zielzelle ausreichend ist, um die intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper zu binden und eine Zerstörung der Zielzelle und/oder eine Immunantwort einzuleiten. Unter "geringe Anzahl" wird erfindungsgemäß eine Anzahl von Zielantigenen auf der Zielzelle von mehr als 100 Zielantigenen pro Zielzelle, bevorzugt mehr als 300 und weiterhin bevorzugt mehr als 1000 Zielantigenen pro Zelle verstanden. Die induzierbaren Zielantigene können auch in einer Menge von bis zu 500.000 pro Zielzelle vorliegen, wobei auch Mengen bis zu 400.000, bis zu 300.000, bis zu 200.000 oder bis zu 100.000 pro Zielzelle induzierbar sind. Ein weiterer bevorzugter Mengenbereich, in dem die Zielantigene vorliegen können, ist von 50.000 bis 100.000 und von 5000 bis 50.000.

Beispiele für induzierbare Oberflächenantigene auf Zielzellen (Zielantigene), die für eine Immuntherapie durch intakte bispe-

zifische und trispezifische Antikörper einsetzbar sind, sind Hitzeschock-Proteine und "MHC-Klasse I-verwandte" MIC-Moleküle. Hitzeschock-Proteine (Hsp) werden von der Zelle als Antwort auf Zellstreß synthetisiert. Unter "Zellstreß" ist erfindungsgemäß beispielsweise eine Entartung der Zelle, das Einwirken von Strahlen, chemischen Substanzen und von erhöhter Temperatur auf die Zelle sowie die Infektion der Zelle durch Mikroorganismen zu subsumieren. Zur Zeit sind vier Familien von Hitzeschock-Proteinen bekannt, die aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts differenziert werden. Diese Familien werden als Hsp25, Hsp60, Hsp70 und Hsp90 bezeichnet, wobei die Zahl das ungefähre Molekulargewicht der Streßproteine in Kilo-Dalton wiedergibt. Die Hitzeschock-Proteine zeichnen sich durch hochkonservierte Aminosäuresequenzen aus, wobei der Grad der Konservierung bei über 35 % Aminosäure-Identität, bevorzugt bei 35 - 55 %, weiterhin bevorzugt 55 - 75% und am bevorzugtesten zwischen 75 % bis 85 % Aminosäure-Identität liegt.

Auf folgende Übersichtsartikel wird verwiesen: Annu. Rev. Genet. 27, 437-496 (1993); Biochimie 76, 737-747 (1994); Cell. Mol. Life Sci. 53, 80-129, 168-211 (1997); Experientia 48, 621-656 (1992); Kabakov u. Gabai, Heat Shock Proteins and Cytoprotection, Berlin: Springer 1997.

Hitzeschock-Proteine werden im Normalfall auf gesundem Gewebe nicht exprimiert. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, daß Hitzeschock-Proteine beispielsweise auf Tumorzelllinien und auf Tumormaterial aus Patienten exprimiert werden können ( Melcher et al., Nature Medicine, 4:581, 1998). Die Expression der Hitzeschock-Proteine auf den Tumorzelllinien ist aber relativ schwach und deshalb für bisher bekannte immuntherapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern und unvollständigen (F(ab)2) bispezifischen Antikörpern ungeeignet.

Beispiele für Hitzeschock-Proteine sind Hsp60 und Hsp70/72.

Gleiches gilt für MIC-Moleküle. Auch diese Moleküle sind durch

Zellstreß, wie oben näher definiert, induzierbar. MIC-Moleküle sind MHC I-verwandte Moleküle, die unter Kontrolle von Hitzeschock-Promoter-Elementen stehen (Groh et al., PNAS 93: 12445, 1996). Beispiele für MIC-Moleküle sind MIC A und MIC B. Auch für MIC-Moleküle konnte gezeigt werden, daß sie auf Normalgewebe nicht oder nur in so geringer Menge exprimiert werden, daß sie als Zielstruktur zur Erkennung durch einen Antikörper, um eine Zerstörung der Zielzelle zu erreichen, nicht geeignet sind, während sie auf beispielsweise epithelialen Tumoren in einer solchen Menge exprimiert werden, daß sie durch die erfindungsgemäß bereitgestellten bispezifischen und trispezifischen Antikörper bei einer Immuntherapie als Zielantigene einsetzbar sind.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie gegen zumindest ein Zielantigen auf einer Zielzelle gerichtet sind, welches induzierbar ist und auf der Zielzelle im nicht induzierten Zustand nicht oder im wesentlichen nicht vorkommt. Diese Zahl liegt beispielsweise bei ca. 100 Zielantigenen/Zelle. Dies heißt jedoch nicht, daß derartige Zielantigene auf anderen Zellen, d.h. Nicht-Zielzellen, nicht vorkommen können. Beispielsweise kommen auf sich schnell regenerierendem Gewebe, z.B. den Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes, auch im physiologischen Zustand, konstitutiv exprimiert, Hitzeschockproteine vor. Diese Hitzeschockproteine werden jedoch von der vorliegenden Erfindung nicht mit umfaßt, da sie nicht induzierbar sind, sondern bereits auf Normalgewebe vorkommen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper, die gegen Hitzeschockproteine gerichtet sind, können auch bestimmte Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes zerstört werden, da diese, wie oben ausgeführt, konstitutiv Hitzeschockproteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die mögliche Zerstörung dieser Zellen ist für einen Patienten zwar mit gewissen Nachteilen verbunden, die jedoch im Vergleich zur erzielbaren Tumorzerstörung gering anzusetzen sind.

Das sich schnell regenerierende Gewebe ist somit nicht primäres Target der erfindungsgemäßen Antikörper, kann jedoch dann von den Antikörpern "getroffen" werden, wenn der erfindungsgemäße Antikörper nicht nur die induzierbaren Zielantigene auf der Zielzelle erkennt, sondern diese Antigene z.B. auch auf sich schnell regenerierendem Gewebe vorkommen. Da sich dieses Gewebe jedoch schnell teilt, kann nach Absetzen der Antikörper-Therapie der ursprüngliche Zustand dieses Gewebes relativ rasch so wieder hergestellt werden, daß es seine physiologische Aufgabe wieder erfüllen kann. Die Erfindung ist also nicht darauf gerichtet, daß die erfindungsgemäßen bispezifischen und trispezifischen Antikörper Antigene auf z.B. sich schnell regenerierendem Gewebe erkennen, welche dort unter Umständen konstitutiv exprimiert werden, sondern die Erfindung umfaßt ausschließlich solche Antikörper, die gegen Zielantigene gerichtet sind, die auf der Zielzelle induzierbar sind und nach Induktion, beispielsweise auch konstitutiv, exprimierbar sind.

Erfindungsgemäß werden unter "induzierbar" solche Zielantigene verstanden, die hier operationell tumorspezifisch sind und im physiologischen Zustand auf der Zelle nicht oder nur in einer solchen Anzahl vorkommen, daß eine Immunantwort gegen sie nicht induzierbar ist oder eine Zerstörung der Zielzellen aufgrund dieser geringen Anzahl nicht oder in einem nicht wesentlichen, therapeutisch nutzbaren Umfang stattfindet.

Als induzierbare Zielantigene auf einer Zielzelle sind nicht nur solche auf einer Tumorzelle zu verstehen, sondern auch Antigene, die induziert werden, wenn die Zielzelle beispielsweise durch einen Mikroorganismus infiziert wird. Unter "Mikroorganismus" wird erfindungsgemäß jeder Organismus verstanden, der die Zielzelle so beeinflusst, daß auf seiner Oberfläche ein vom Mikroorganismus induziertes Zielantigen im oben beschriebenen Umfang exprimiert wird. Unter Mikroorganismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze verstanden. Zu den Bakterien gehören beispielsweise Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mycoplasmen und Rickett-

sien. Von den Protozoen mitumfaßt werden insbesondere Plasmodien. Von den Viren umfaßt werden beispielsweise Retroviren, Adenoviren, Herpesviren, Hepatitis-Viren, Togaviren, Pockenviren usw. Entscheidend ist, daß in Zellen, die von einem oder mehreren dieser Mikroorganismen infiziert wurden, auf der Zell-

oberfläche Antigene exprimiert werden, die durch die Mikroorganismen-Infektion induziert werden. Dabei handelt es sich um Antigene, die von den Zielzellen als Antwort auf die Mikroorganismen-Infektion produziert werden und auf der Zelloberfläche erscheinen (wirtseigene Antigene), nicht dagegen um Zielantigene, die durch die Mikroorganismen selbst produziert werden. Die Infektion einer Zielzelle durch einen Mikroorganismus führt ebenfalls zu einer Zellstreß-Situation für die Zelle, die als Antwort hierauf die Expression bestimmter Proteine induziert, beispielsweise von Hitzeschock-Proteinen und von MIC-Proteinen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper führen nicht nur einen Typ von Immunzellen, sondern T-Zellen und akzessorische Zellen an die Zielzelle heran, und sie sind aus diesem Grund für die Erkennung induzierbarer Oberflächenantigene als operationelle Zielstrukturen besonders geeignet. Es konnte gezeigt werden, daß bereits wenige Zielantigene in einer Menge von 100 bis 5000 pro Zelle auf der Zielzelle ausreichend sind, um diese zu zerstören. Die hierzu durchgeführten in vitro-Experimente mit Stammzellpräparaten (PBSZ) sind im nachfolgenden Beispiel 1 beschrieben. Somit ist die erfindungsgemäße Klasse intakter bispezifischer und trispezifischer Antikörper befähigt, auch bei einer sehr geringen Expression der Zielantigene Tumorzellen oder Zielzellen zu zerstören oder nach deren Erkennung eine Immunantwort zu initiieren.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können, da sie gegen induzierbare Antigene gerichtet sind, dazu beitragen, das Problem fehlender zielzellspezifischer, für eine Immuntherapie notwendige Zielantigene auf Tumorzellen und auf durch Mikroorganismen infizierten Zellen zu lösen. Da derartige induzierbare Antigene



nicht nur auf Tumorzellen vorkommen, sondern generell in Stressituationen produziert werden, können auch Erkrankungen immuntherapeutisch angegangen werden, die durch Infektion von beispielsweise Viren, Einzellern, Bakterien oder Pilzen ausgelöst wurden. Hierbei handelt es sich um die oben bereits näher beschriebenen MIC-Moleküle und Hitzeschock-Proteine.

Die oben beschriebenen intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper werden zur Induktion einer Immunantwort und/oder zur Zerstörung der Zielzelle therapeutisch eingesetzt. Die Antikörper werden in Form einer pharmazeutischen Zubereitung verabreicht, die übliche Träger und/oder Hilfsstoffe enthalten kann, um eine Stabilität und eine günstige Verabreichungsform verbunden mit hoher Verträglichkeit und Wirksamkeit zu ermöglichen. Durch die Applikation der Antikörper kann eine Prophylaxe und Behandlung von beispielsweise Tumorerkrankungen erreicht werden, so daß eine Immunität gegen den Erreger bzw. gegen den Tumor, bevorzugt eine Langzeit-Immunität, erreicht wird.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten Antikörper können in einer relativ geringen Menge eingesetzt werden, d.h. sie sind bereits in einer Menge von 5 µg bis 10 mg pro Patient wirksam, um die erfindungsgemäße Immunität, beispielsweise Tumورimmunität, oder die erfindungsgemäß erreichbare Zerstörung der Zielzelle zu bewirken. Bevorzugt liegt die Applikationsmenge im Bereich von 10 µg bis 100 µg pro Patient, sie kann jedoch auch, falls notwendig, darüber liegen, also im Bereich von 100 µg bis 5 mg pro Patient.

Bei einem Tumorpatienten sollte, da die Induktion einer Tumорimmunität eine gewisse Zeit benötigt, bei Beginn der Therapie eine Minimal Residual Disease (MRD) Situation mit wenigen verbliebenen Tumorzellen vorliegen. Unter MRD versteht man den Zeitraum nach der Reduktion von größeren Tumormengen mit geeigneten Methoden, wie beispielsweise der Entfernung des Primärtumors durch chirurgische Maßnahmen, indem noch residuelle Tumorzellen existieren, die zwar u.U. nicht nachweisbar sind, aber

nach einer gewissen Zeit zum Rezidiv führen. Der Beginn der Therapie kann aber bereits vor Entfernung des Tumors liegen, um sicherzustellen, daß genügend Tumorzellen durch die bispezifischen oder trispezifischen Antikörper gebunden und dem Immunsystem präsentiert werden.

---

Bei den erfindungsgemäß verwendbaren geringen Mengen von verabreichten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörpern ist die Gefahr schwerwiegender Nebenwirkungen wesentlich verringert. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß eine humorale Immunantwort mit komplement-fixierenden Antikörpern (bei Menschen die Isotypen IgG1 und IgG3), die in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören, induziert wird.

Durch die Bindung des Antikörpers an die Fc-Rezeptor positive Zelle wird diese aktiviert, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder von co-stimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

Die erfindungsgemäßen Antikörper übertragen durch die co-stimulatorischen Antigene auf der akzessorischen Zelle an die T-Zelle zumindest ein zweites Aktivierungssignal, welches für eine physiologische Aktivierung der T-Zelle benötigt wird, wobei sich diese Aktivierung in der Hochregulation von Aktivierungsmarkern, der Zerstörung der Zielzelle und/oder in einer Proliferation der T-Zelle zeigt. Nach Verabreichung des Antikörpers an den Patienten wird hierdurch eine Tumormunität, bevorzugt eine Langzeit-Tumormunität, initiiert.

Die erfindungsgemäß erreichbare Immunantwort ist dadurch charakterisiert, daß in einem Organismus das körpereigene Immunsystem derart aktiviert wird, daß es zu einer dauerhaften Zerstörung und/oder Kontrolle des Tumors oder der Infektionserkrankung kommt. Weiterhin vorteilhaft ist bei Verwendung der hier beschriebenen Antikörper die Reduktion von Nebenwirkungen, die üblicherweise eingesetzte Antikörper, beispielsweise monoklonale Antikörper, besitzen. Zielstruktur für die erfindungsgemäßen

Antikörper sind induzierbare Oberflächenantigene gemäß der Definition der vorliegenden Erfindung, d.h. also solche, die auf der Zielzelle nicht vorkommen oder in einer vernachlässigbaren Menge, so daß eine direkte Störung der Zielzelle oder eine Immunantwort, insbesondere eine lang andauernde Immunantwort bzw. Immunität nicht induziert oder zumindest nicht in einem therapeutisch vernünftigen Ausmaß induziert wird.

Erfindungsgemäß ist jede Art von Tumoren behandelbar, die unter die oben angegebene Definition fällt. Insbesondere therapierbar sind epitheliale Tumore, Adenokarzinome, Kolonkarzinome, Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Lungenkarzinome und Hals-, Nasen- und/oder Ohrentumore. Weiterhin behandelbar sind nicht-epitheliale Tumoren wie Leukämien und Lymphome. Weiterhin therapierbar sind virusinduzierte Tumoren, beispielsweise Lebertumore oder Cervixkarzinome.

Durch die Anwendung der erfindungsgemäß bereitgestellten Antikörper sind auch durch Mikroorganismen infizierte Zielzellen und die hierdurch induzierten Erkrankungen therapierbar. Hierzu gehören beispielsweise Infektionen durch CMV und HIV.

Unter "Zielzelle" sind erfindungsgemäß alle Zellen zu verstehen, die in Form einer Tumorzelle entartet sind oder die durch einen Mikroorganismus infiziert wurden und die als Antwort auf die Zell-Entartung oder die Mikroorganismus-Infektion ein Antigen exprimieren, welches in der Zielzelle im Normalzustand, d.h. ohne Entartung bzw. ohne Infektion, nicht produziert wird oder in einem so geringen Maße, daß hierdurch eine Immuntherapie nicht induzierbar ist oder eine immuntherapeutische Zerstörung der Zielzelle nicht möglich ist.

Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen einen funktionellen Fc-Teil besitzen, und sie müssen heterologer Natur sein, d.h. die Antikörper sind dann aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Frag-

mente bzw. einzelne ausgetauschte Aminosäuren) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden bispezifische und/oder trispezifische Antikörper eingesetzt, die in der Lage sind, die Fc-Rezeptor-positive Zelle zu aktivieren. Hierdurch wird die Expression von Cytokinen und/oder co-stimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht.

Bei den trispezifischen Antikörpern erfolgt die Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen bevorzugt beispielsweise über den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen oder auch über andere Antigene auf Fc-Rezeptor positiven Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen), wie z.B. den Mannose-Rezeptor.

Die erfindungsgemäß verwendbaren heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper sind zum Teil an sich bekannt, zum Teil werden sie aber auch in der vorstehenden Anmeldung zum ersten Mal beschrieben.

Nachfolgend wird die Erfindung insbesondere anhand von bispezifischen Antikörpern beschrieben. Die bispezifischen Antikörper stellen jedoch nur eine Ausführungsform der Erfindung dar. Es ist auch möglich, trispezifische Antikörper mit den oben angegebenen Eigenschaften einzusetzen. Weiterhin wird die Erfindung insbesondere am Beispiel der Induktion einer Tumormunität dargestellt. Dies ist jedoch ebenfalls nur eine mögliche Ausführungsform der Erfindung, die ganz allgemein für immuntherapeutische Zwecke einsetzbar ist. Beispielsweise ist es auch möglich, durch die Anwendung der erfindungsgemäß bereitgestellten Antikörper eine Immunität gegen Mikroorganismen zu erreichen, die auf den infizierten Zielzellen u.a. die hier beschriebenen Zielantigene induzieren.

Bezugnehmend auf das Merkmal (a) wird das 1. Signal beispielsweise über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle übertragen und kann damit, für sich allein betrachtet, zu einer unphysio-

logischen Aktivierung der T-Zelle führen. Die Zelle wird hierdurch anergisiert und kann auf T-Zell-Rezeptor vermittelte Stimuli nicht mehr angemessen reagieren. Durch die erfindungsgemäßen bispezifischen oder trispezifischen Antikörper wird zusätzlich gleichzeitig durch die kostimulatorischen Antigene auf der Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle zumindest ein 2. Aktivierungssignal übertragen, das zu einer physiologischen Aktivierung der T-Zelle und in der Folge entweder zu einer Zerstörung der Zielzelle und/oder einer Proliferation der T-Zelle führt. Als weiteres Kriterium für die Aktivierung der T-Zelle kann die Hochregulation von Oberflächenantigenen wie z.B. CD2, CD25 und/oder CD28 und/oder die Sekretion von Cytokinen wie z.B. IL-2 oder INF- $\gamma$  herangezogen werden.

Mit den erfindungsgemäß verwendeten bsAk werden also T-Zellen aktiviert und gegen die Zielzellen redirigiert. Unspezifische Aktivierungen von T-Zellen ohne Redirektion hatten in der Immuntherapie generell wenig Erfolg.

Auf der Zielzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) in unmittelbarer Nachbarschaft der Zielzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörpervermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt (siehe Abb. 1 und 3). D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Zielzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Immunität, beispielsweise gegen den Tumor, erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen

Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1), können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2).

---

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der, an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle, an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung. Zielzell-spezifische T-Zellen, die an der Zielzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach einer ex vivo-Langzeit-Inkubationsbehandlung ebenfalls reaktiviert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Zielzellimmunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Zielzellbestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und NK-"Natural Killer"-Zellen).

Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl zielzellspezifische CD4- wie auch CD8-positive Zellen generiert werden. Zielzellspezifische CD4-Zellen spielen darüberhinaus eine wichtige Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort im Zusammenhang mit der T-B-Zell Kooperation.

Bispezifische und trispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an zielzellassoziierte Antigene auf der Zielzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Zytokinen oder Apoptose-vermittelnde Mechanismen die Zielzellen zerstören. Darüber hinaus besteht offenbar

die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird. Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z.B.

Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt und diese veranlaßt selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben (Abb. 1). Auf diese Weise kann offensichtlich eine T-Zellantwort u.U. auch gegen bislang unbekannte, zielspezifische Peptide induziert werden.

Durch Redirektion von u.U. anergisierten, zielspezifischen T-Zellen an Zielzellen mittels bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper bei gleichzeitiger Kostimulation derartiger T-Zellen durch akzessorische Zellen welche an den Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers binden, könnte die Anergie von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) aufgehoben werden. D.h. eine im Patienten gegen die Zielzelle existierende T-Zell-Toleranz kann mittels intakter heterologer bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper gebrochen und damit eine dauerhafte Immunität, z.B. eine Tumormunität, induziert werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, zielspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fcγ-Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß einsetzbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fcγ-Rezeptor 1 positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Zytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 und/oder TNF-α.

Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder



anti-CD5 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-operationell-induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen-Antikörper.

Bevorzugt einsetzbare Spezifitäten der erfindungsgemäßen Antikörper, die mit den unten genannten Isotyp-Kombinationen kombinierbar sind, sind beispielsweise:

Anti-CD3 X Anti-Hsp70  
Anti-CD2 X Anti-Hsp70  
Anti-CD28 X Anti-Hsp70  
Anti-CD5 X Anti-Hsp70

Anti-CD3 X Anti-MICA  
Anti-CD2 X Anti-MICA  
Anti-CD28 X Anti-MICA  
Anti-CD5 X Anti-MICA

Anti-CD3 X Anti-MICB  
Anti-CD2 X Anti-MICB  
Anti-CD28 X Anti-MICB  
Anti-CD5 X Anti-MICB

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper weisen zumindest eine T-Zell-Bindungsarm, einen Zielzell-Bindungsarm und einen an Fc-Rezeptor positive Zellen bindenden Bindungsarm auf. Dieser zuletzt genannte Bindungsarm kann ein anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm oder ein Mannose-Rezeptor-Bindungsarm sein.

Der bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein heterologer in-

takter Ratte/Maus bispezifischer Antikörper.

Mit den erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörpern werden T-Zellen aktiviert und gegen die Zielzellen redirigiert. Bevorzugt einsetzbare heterologe intakte bispezifische Antikörper werden aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotyp-Kombinationen ausgewählt:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],  
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit \* gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-  
Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-  
Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-

IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

---

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3, orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

---

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*-[CH3].

Die oben genannten Antikörper sind beispielhaft genannt. Diese und andere erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper können vom Fachmann anhand von speziellen Techniken hergestellt werden.

Beispielhaft hierfür sind die Literaturstellen (7) bis (11) genannt.

induziert wurden. Zur Induktion von Antigenen und ihrer Bedeutung für die vorliegende Erfindung wird auf die obigen Ausführungen verwiesen.

In der nunmehr beschriebenen Ausführungsform der Erfindung werden heterologe intakte bispezifische und/oder trispezifische Antikörper verwendet. Um ein Überleben der Tumorzellen nach Reinfusion zu verhindern, wurden die Tumorzellen in an sich bekannter Weise behandelt, beispielsweise durch Bestrahlung oder Hitzebehandlung. Die Tumorzellen werden nach Bestrahlung mit den intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern in Kontakt gebracht. Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen einen funktionellen Fc-Teil besitzen, und sie müssen heterologer Natur sein, d.h. die Antikörper sind dann aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Fragmente) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

Durch dieses Verfahren und den Einsatz der hier beschriebenen Antikörper ist gewährleistet, daß nach Infusion der Antikörper in den Patienten, aus dem die Tumorzellen zuvor entnommen wurden, eine Tumormunität aufgebaut wird. Die Reinfusion der behandelten Tumorzellen erfolgt bevorzugt in einen Patienten nach der Behandlung des Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Bei Patienten mit wenig verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch sein kann, wird das erfindungsgemäß bereitgestellte Verfahren besonders erfolgreich anwendbar sein.

Erfindungsgemäß werden zwei Verfahrens-Varianten unterschieden:

1. Kurzzeitinkubation, und
2. Langzeitinkubation

Bei der Kurzzeitinkubation werden die autologen Tumorzellen

nach ihrer Gewinnung zunächst inaktiviert. 30 Minuten bis 4 Stunden, bevorzugt 30 Minuten bis 2 Stunden, vor Reinfusion der behandelten Zielzellen werden die erfindungsgemäßen intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern in den Patienten infundiert. Die behandelten Tumorzellen werden dann zur Reinfusion vorbereitet und infundiert.

---

Bei der Langzeitinkubation werden die autologen Tumorzellen ebenfalls zunächst durch beispielsweise Bestrahlung oder Temperaturerhöhung inaktiviert. Anschließend werden hierzu Blutzellen des Patienten, bevorzugt mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMK = peripheral blood mononucleated cells) sowie die erfindungsgemäßen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper zugegeben, und diese Mischung wird dann über einen längeren Zeitraum, beispielsweise 1 bis 14 Tage lang, bevorzugt 3 bis 10 Tage und weiterhin bevorzugt 6 bis 10 Tage, inkubiert. Hierdurch wird eine Vielzahl von Immunzellen bereits ex vivo gegen den Tumor "geprimt". Anschließend werden diese in den Patienten reinfundiert. Durch die Langzeitinkubation wird auch eine Internalisierung der Antikörper und ihr Abbau erreicht.

Erste in vitro-Ergebnisse zeigen, daß durch derartig vorbehandelte Immunzellen Tumorzellen ohne weitere Zugabe von bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern zerstört werden können.

Sowohl bei der Kurzzeitinkubation als auch bei der Langzeitinkubation werden T-Zellen an die Tumorzellen mittels der an den Tumorzellen immobilisierten intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper redirigiert; gleichzeitig findet eine Bindung von Fc-Rezeptor positiven Zellen an den Fc-Teil des bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpers nach Reinfusion statt. Dabei werden die Fc-Rezeptor positiven Zellen durch Bindung an die Fc-Teile von (an der T-Zelle bzw. Tumorzelle) immobilisierten intakten bispezifischen Antikörpern aktiviert.

---

Zur Verbesserung des Immunisierungserfolges können die entweder nach dem Kurzzeit-Inkubationsverfahren oder nach dem Langzeit-Inkubationsverfahren mit den Antikörpern behandelten Tumorzellen nicht nur einmal an den Patienten appliziert, sondern wahlweise auch mehrfach verabreicht werden.

Auf der Tumorzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörper-vermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt (siehe Abb. 1 und 3). D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Tumorzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Tumormunität erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1), können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2).

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der, an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle, an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor

positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung. Tumor-spezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach der erfindungsgemäßen ex vivo-Vorbehandlung ebenfalls reaktiviert werden.

---

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Tumorummunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Tumorbestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und NK-"Natural Killer"-Zellen). Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl tumorspezifische CD4- wie auch CD8-positive Zellen generiert werden. Tumorspezifische CD4-Zellen spielen darüberhinaus eine wichtige Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort im Zusammenhang mit der T-B-Zell-Kooperation.

Es gibt erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumorummunität nach Behandlung mit einem syngenem Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumoringektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumoringektion 144 Tage nach der ersten Tumoringektion - ohne eine erneute Gabe von bsAk.

Weitere Vorteile bei der ex vivo-Immunisierung mittels bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper sind (i) die Minimierung von möglichen Nebenwirkungen, (ii) die kontrollierte Bindung des Tumorbindungsarms an die Tumorzelle außerhalb des Körpers, (iii) ein möglichst geringer Verbrauch von bispezifischen und trispezifischen Antikörpern, (iv) und die Reproduzierbarkeit bzw. Steuerung des Immunisierungserfolges durch Verabreichung einer definierten Anzahl von Tumorzellen. Dabei sind grundsätzlich zwei Vorgehensweisen möglich, die unten im

---



einzelnen erläutert werden. Ein wichtiger Aspekt bei der Langzeitinkubation ist, daß der eingesetzte bispezifische oder trispezifische Antikörper innerhalb der projektierten Inkubationszeit verbraucht und abgebaut wird. Damit würde für eine derartige Immunisierung die langwierige Arzneimittelanmeldung entfallen.

Beim Langzeit-Inkubationsverfahren werden die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit den inaktivierten, autologen Tumorzellen vermischt und zusammen mit den Antikörpern für einen Zeitraum von 1 - 14 Tagen, bevorzugter 3 bis 10 Tagen, weiterhin bevorzugt 6 bis 10 Tagen, inkubiert. Diese Inkubation erfolgt bevorzugt bei 37°C unter sterilen Bedingungen und unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Production = GMP) in einem Brutschrank.

Die obengenannten Inkubationsbedingungen sind nur beispielhaft zu verstehen. In Abhängigkeit von den Tumorzellen und den verwendeten Antikörpern können auch andere Zeiträume, Temperaturbedingungen etc., allgemein andere Inkubationsbedingungen, gewählt werden. Der Fachmann kann durch einfache Versuche diese Bedingungen festlegen.

Bei der Ex-vivo-Immunisierung werden die Tumorzellen bevorzugt in einer Menge von  $10^7$  bis  $10^9$  Zellen, weiterhin bevorzugt in einer Menge von ca.  $10^8$  Zellen, verwendet. Die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut werden in einer Menge von ca.  $10^8$  bis  $10^{10}$  Zellen zugegeben. Selbstverständlich ist es für den Fachmann auch möglich, andere Inkubationsbedingungen zu wählen, die durch Laborversuche ermittelt werden können (bspw. Änderungen in der Zellzahl und Inkubationsdauer).

Die eingesetzten autologen Tumorzellen werden, um nach Reinfusion ein weiteres Überleben der Tumorzellen zu verhindern, bspw. bestrahlt. Beispielsweise werden  $\gamma$ -Strahlen verwendet, die bspw. in einer Dosisstärke von 20 bis 100 Gy eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

---

### IMMUNISIERUNGSPROTOKOLLE

#### **Ex vivo-Immunisierung (Kurzzeitinkubation)**

1. Herstellung einer Einzelzellsuspension ( $10^7$ - $10^9$  Zellen) aus autologem Tumormaterial (oder allogenen Tumorzellen desselben Tumortyps) mit anschließender  $\gamma$ -Bestrahlung (20-100 Gy) oder Hitzebehandlung (zunächst ca. 42°C für 30 min.; anschließend ca. 60°C für 1 Stunde);
2. Infusion der bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper (5-100  $\mu$ g) 2 bis 4 Stunden vor Reinfusion des Zellgemisches in den Patienten;
3. Reinfusion des Zellgemisches (i.v.)

#### **Ex vivo-Immunisierung (Langzeitinkubation)**

1. Herstellung einer Einzelzellsuspension ( $10^7$ - $10^9$  Zellen) aus autologem Tumormaterial (oder allogenen Tumorzellen desselben Tumortyps) mit anschließender  $\gamma$ -Bestrahlung (50-100 Gy) bzw. Hitzebehandlung;
2. Zugabe von bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern (5-50  $\mu$ g),  
und Zugabe von PBMC ( $10^8$ - $10^{10}$ ), [alternativ:  $1 \times 10^9$  Zellen aus T-Zellapherese]
3. nach 5 bis 7 Tagen Kontrolle der T-Zell-Reaktivität durch Transfer von Aliquots auf z.B. allogene Brustkrebszelllinien (MCF-7, MX-1)
4. Reinfusion (i.v.) der kultivierten PBMC am Tag 4 bis 14 in den Patienten (bei T-Zellapherese Kryokonservierung)

Abkürzungen: PBMC, peripheral blood mononucleated cells = mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut; i.v., intravenös.

Ein ähnlicher aber auf den Zusatz von Zytokinen angewiesener und mit konventionellen bsAk (keine Aktivierung von akzessorischen Zellen durch bsAk der Subklassenkombination Ratte IgG2B X Ratte IgG1) durchgeführter Ansatz zeigte die prinzipielle Wirksamkeit einer derartigen ex vivo-Immunisierung im Tiermodell (5).

Im Gegensatz dazu liegt der Vorteil des hier offengelegten Verfahrens in der "Selbstversorgung" mit den für die Hochregulation von z.B. MHC 1 auf der Tumorzelle benötigten Zytokinen (wie INF- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ ) durch die gleichzeitige Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, Abb.) an der Tumorzelle. Dies wird durch die eingangs erwähnte besondere Subklassenkombination des hier verwendeten intakten bsAk erreicht. Bei der Kurzzeitinkubation finden diese Vorgänge im Patienten statt. Weitere Vorteile bei der Kurzzeitinkubation sind (i) Umgehung der sonst notwendigen Kultivierung der Zellsuspension mit serumhaltigen Medium. (ii) Damit entfällt auch die kostenintensive Kultivierung unter GMP-Richtlinien.

Vorteil bei der Langzeitinkubation ist, daß der bsAk sich in vitro nach einiger Zeit selber verbraucht (und somit auch diese Methode nicht als Medikament, sondern als "medical device" etabliert werden kann).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die erfindungsgemäßen Antikörper eingesetzt, um die Anzahl kontaminierender Zielzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo zu vermindern. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper für einen ausreichend langen Zeitraum mit Stammzelltransplantaten, die kontaminierende Zielzellen enthalten können, in Kontakt gebracht werden, um

die Anzahl von kontaminierenden Zielzellen im Stammzelltransplantat zumindest zu verringern. Z.B. werden hier Stammzelltransplantate aus Patientinnen mit einem Mammakarzinom oder Ovarialkarzinom oder aus Patienten mit Leukämien, Lymphom, Hodenkarzinom oder anderen Chemotherapie sensitiven Karzinomen, behandelt. Erfindungsgemäß können aber auch Stammzelltransplantate aus Patienten behandelt werden, die durch Mikroorganismen, beispielsweise durch Viren, infiziert sind. Beispiele für mit Viren infizierte Stammzelltransplantate sind solche, die durch CMV oder HIV infiziert wurden. Die erfindungsgemäß verwendbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörper wurden bereits vorstehend beschrieben.

Das Stammzelltransplantat wird mit den bispezifischen Antikörpern für einen Zeitraum von 4 bis 72 Stunden, bevorzugt für einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden, inkubiert, wobei beispielsweise eine Temperatur im Bereich von 20 bis 25°C, vorzugsweise Raumtemperatur, gewählt wird. Die Zellen im Stammzelltransplantat liegen beispielsweise in einer Dichte von 30000 bis 75000 Zellen pro  $\mu$ l vor.

Nach erfolgter ex-vivo Behandlung werden die Stammzelltransplantate in den Patienten, möglicherweise auch nach weiterer Aufreinigung, reinfundiert. Vollinhaltlich wird hier auf die DE 196 49 223.8 hingewiesen, deren Offenbarungsgehalt in die vorstehende Anmeldung voll mit integriert wird.

In dieser Ausführungsform der Erfindung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden kontaminierende Tumorzellen in Stammzellpräparaten (Leukaphereseprodukten) mittels bispezifischer oder trispezifischer Antikörper in vitro eliminiert. Diese Antikörper weisen die im Anspruch 1 spezifizierten Merkmale auf, insbesondere werden diese Antikörper so ausgewählt, daß sie an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle binden, ~~welches induzierbar ist und im nicht-induzierten Zustand (Normalzustand) nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl,~~ daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle oder die In-

duktion einer Immunantwort durch den Antikörper nicht ausreicht.

Beispiele für die verwendbaren, durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Antikörper wurden gegeben. Diese weisen insbesondere die bereits oben dargestellten Spezifitäten auf und können bevorzugt mit den dargestellten Isotyp-Kombinationen verknüpft werden.

Das Inkontaktbringen der bispezifischen Antikörper und der Stammzellen mit den kontaminierenden Zielzellen erfolgt unter solchen Bedingungen, die sowohl eine Bindung der bispezifischen oder trispezifischen Antikörper an die Zielzellen und die T-Zellen als auch eine Beibehaltung der Lebensfähigkeit der Stammzellen gestatten. Die Einhaltung dieser Parameter ist für die Erhaltung und die Vitalität der Stammzellen wie auch der Lymphozyten notwendig. Beispielsweise wird das Stammzelltransplantat (Leukaphereseprodukt) etwa 4 - 72 Stunden, bevorzugt 24 - 48 Stunden, mit bispezifischen Antikörpern bei Raumtemperatur und einer Zelldichte von 30.000 - 75.000 Zellen/ $\mu$ l, bevorzugt 30.000 - 50.000 Zellen/ $\mu$ l, unter leichtem Schwenken inkubiert. Bei einer Gesamtzellzahl von ca.  $10 \times 10^9$  Zellen/Stammzelltransplantat ist eine bsAk-Menge von 5 - 50, 50 - 100, 100 - 500  $\mu$ g für die Tumorzellzerstörung ausreichend. Ein weiterer wichtiger Punkt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Verwendung von sogenannten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörpern. Diese sind nicht nur in der Lage (aufgrund der hier verwendeten Spezifitäten) T-Zellen an die Tumorzellen zu führen, sondern sie sind aufgrund der Effektorfunktionen des Fc-Teils darüber hinaus geeignet, mittels Komplement vermittelter Lyse oder durch Bindung von Fc-Rezeptor positiven Zellen, wie z.B. Makrophagen, Monozyten oder aktivierten neutrophilen Granulozyten, Tumorzellen zu zerstören. Es können somit durch intakte bsAk mehrere tumorzell-zerstörende Mechanismen gleichzeitig aktiviert werden.

Nachfolgend wird anhand eines Beispiels gezeigt, daß die erfin-

dungsgemäß bereitgestellten Antikörper befähigt sind, induzierbare Oberflächenantigene auf Zielzellen zu erkennen und an sie zu binden und eine Immunantwort einzuleiten bzw. die Zielzelle zu zerstören, auch wenn die Zielstrukturen in einer äußerst geringen Menge auf der Zielzelle vorliegen, beispielsweise in einer Menge von 100 bis 10.000 pro Zelle. Die Zielstrukturen können auch in höherer Anzahl vorliegen, beispielsweise bis zu 500.000 (weitere bevorzugte Bereiche sind oben dargestellt). Die erfindungsgemäßen Antikörper wirken jedoch überraschenderweise auch dann, wenn die Zielstrukturen auf der Zielzelle in einer Anzahl von ca. 100 vorliegen, wobei erstaunlicherweise, selbst bei dieser geringen Anzahl von Zielstrukturen auch nur geringste Mengen des Antikörpers notwendig sind, um eine wirksame therapeutische Behandlung durchzuführen, d.h. Mengen von ca. 5 µg können zur Behandlung ausreichend sein.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels dargestellt. Die Erfindung ist jedoch nicht auf dieses spezielle Beispiel beschränkt, sondern kann im Rahmen der vorliegenden Beschreibung und der anliegenden Ansprüche abgewandelt werden.

#### BEISPIEL 1

Nachdem in präklinischen Tiermodellen die herausragende Wirksamkeit von intakten bsAk nicht nur in vitro, sondern auch in vivo belegt werden konnte (Lindhofer et al., Blood, 88:4651, 1996), wurde die Reinigung von Stammzellpräparaten von kontaminierenden Tumorzellen als weitere Anwendungsmöglichkeit entwickelt (Lindhofer et al., Exp. Hematol. 25:879, 1997).

Auf diesen Versuchen aufbauend, konnte in Folgeversuchen mit kompletten Stammzellpräparaten (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen), insbesondere die Wirksamkeit im untergesättigten Bereich der Zielantigene nachgewiesen werden. D.h. es wurde, in Titrationsversuchen, so wenig intakter bsAk verabreicht, daß in einem PBSZ

(Periphere Blut-Stammzellen)-Präparat mit ca.  $6,5 \times 10^9$  T-Zellen, bei einer Gabe von  $5 \mu\text{g}$  Antikörper/Präparat, lediglich 3000 CD3 Moleküle von ca. 30.000 CD3 Molekülen/T-Zelle mit dem bsAk gebunden vorlagen (siehe Berechnung). Trotzdem waren die intakten bsAk in der Lage, auch unter diesen Bedingungen, die Zielzellen (hier Tumorzelle: HCT-8) zu zerstören.

---

Die Versuche waren so aufgebaut, daß von derartig behandelten PBSZ-Präparaten Aliquots entnommen und mit einer definierten Menge von Tumorzellen kontaminiert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen selbst bei dieser geringen Konzentration von intakten bsAk, bei der nur ein Teil der Zielantigene besetzt vorliegen, zerstört werden.

Die Auswertung des oben beschriebenen Experiments führte zu folgenden Ergebnissen:

Patient WaGr Gesamtzellzahl PBSZ:  $2,5 \times 10^{10}$  + 5  $\mu$ g bsAk

Aliquot  $5 \times 10^6$  PBSZ + bsAk + Tumorzellen

Platte	kein Antikörper	bsAk anti- CD3Xepcam	Tumorzellen/mononukleäre Zellen (PBSZ)/Loch
24er	6/6*	0/6°	$2 \times 10^4$ / $2 \times 10^6$
96er	12/12	0/12	5000 / $5 \times 10^5$
Tumor- reduktion: keine		>5log	Tumorzellanteil: 1% °Σ=1,2x10 <sup>5</sup> Tumorz./6- Löcher

- \* Anzahl der Löcher mit Tumorwachstum, von 6 bzw. 12 plattierten Löchern, nach 14 Tagen Kultivierung.
- ° Titrationsversuche mit der Tumorzelllinie HCT-8 haben ergeben, daß bereits 1-2 Tumorzellen/Loch ausreichen, um nach 14 Tagen Kultivierung ein deutliches visuell auswertbares Tumorwachstum in 95% aller plattierten Löcher darzustellen.

#### Berechnung:

Ein intakter bsAk hat ein Molekulargewicht von 150 KDa. D.h. 1 Mol sind 150 Kg und entsprechen definitionsgemäß  $6 \times 10^{23}$  Molekülen. Damit entsprechen 5  $\mu$ g ca.  $2 \times 10^{13}$  Molekülen.

Nachdem in einem Stammzellpräparat  $6,5 \times 10^9$  T-Zellen bestimmt wurden und eine T-Zelle ca. 30.000 CD3 Moleküle trägt, kommt man auf eine Gesamtzahl von  $19,5 \times 10^{13}$  CD3 Molekülen im Stamm-



zellpräparat.

Da jeder bsAk einen anti-CD3 Bindungsarm besitzt, kann gefolgert werden, daß theoretisch, setzt man die beiden oben berechneten Molekülmengen in Bezug, in diesem konkreten Beispiel

---

nicht mehr als ca. 3000 CD3 Moleküle von den bsAk besetzt werden können.

# L I T E R A T U R

1. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fcγ receptors with rat IgG2b, J. Immunolog., 1995, 154: 1852-1860

---

  2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CD3 X CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer Immunol. Immunother. 40: 390, 1995
  3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., and Kirkwood, J. Adoptive cellular immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract). Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PMAODO - 7589 CO, 1993.
  4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339: 71-85, 1992
  5. Guo et al., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. Nature Medicine 3: 451, 1997
  6. Lindhofer et al., Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, J. Immunology 1995, 155:219
-

## ZUSAMMENFASSUNG

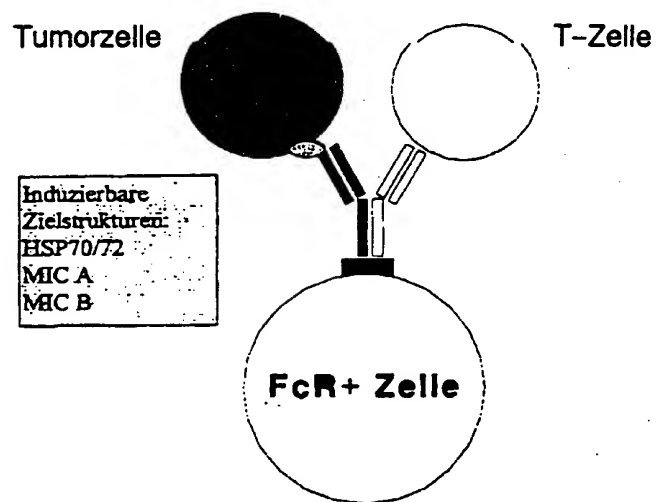
Erfindungsgemäß wird bereitgestellt ein intakter bispezifischer oder trispezifischer Antikörper, der zumindest die nachfolgenden Eigenschaften aufweist:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
- c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und der hierdurch eine Immunantwort induziert und/oder die Zielzellen zerstört, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle nicht ausreicht.

Weiterhin beschrieben werden eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Antikörper enthält sowie Verwendungen des Antikörpers.

(Fig. 1B)



PATENTANWÄLTE  
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. ERNST STURM (1951-1980)  
DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD  
DIPL.-ING. UDO SKUHRA  
DIPL.-ING. REINHARD WEISE  
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH  
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER\*  
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH

FRIEDRICHSTR. 31  
D-80801 MÜNCHEN  
POSTF. / P.O. BOX 440151  
D-80750 MÜNCHEN

\* MOHRENSTR. 20  
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P10508  
Dr.B/La

24. September 1998

Anmelder: Trion Pharma GmbH  
Frankfurter Ring 193a  
80807 München

Bispezifische und trispezifische Antikörper, die spezifisch mit induzierbaren Oberflächenantigenen als operationelle Zielstrukturen reagieren

## PATENTANSPRÜCHE

1. Intakter bispezifischer oder trispezifischer Antikörper, der zumindest die nachfolgenden Eigenschaften aufweist:
  - a) Binden an eine T-Zelle;
  - b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
  - c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und der hierdurch eine Immunantwort induziert und/oder die Zielzellen zerstört, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und ~~im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Ziel-~~ zelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle durch den Antikörper nicht ausreicht.

2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als induzierbare Antigene Hitze-Schock-Proteine oder MHC-Klasse-I verwandte MIC-Moleküle eingesetzt werden.
3. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Hitze-Schock-Proteine HSP25-, HSP60- oder HSP70- (HSP72-) oder HSP90-Proteine und als MIC-Moleküle MIC-A- und MIC-B-Moleküle eingesetzt werden.
4. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen solche Zielantigene gerichtet ist, die nach Induktion auf der Zielzelle in einer Anzahl von mindestens 100 und höchstens 500.000 pro Zielzelle vorliegen.
5. Antikörper nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper weiterhin so ausgewählt wird, daß er zur Aktivierung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt ist, wodurch die Expression von Cytokinen und/oder co-stimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.
6. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie zur Bindung Fc-Rezeptor positiven Zellen befähigt sind, die einen Fcγ-Rezeptor I, II oder III aufweisen.

7. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fcγ-Rezeptor I positive Zellen befähigt sind.
8. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Antikörper zur Induktion von zielzellreaktiven, insbesondere tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort befähigt sind.
9. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zellen binden.
10. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß nach ihrer Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene und/oder die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird.

11. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß die Sekretion von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 als Zytokine und/oder von TNF- $\alpha$  erhöht wird.
12. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der bispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.
13. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der bispezifische Antikörper aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotypkombinationen ausgewählt wird:  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,  

---

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,



Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],  
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

---

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit \* gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3, orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-  
Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale  
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale  
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale  
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale  
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-  
IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-  
IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-  
IgG3\*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-  
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale  
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-

IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3\*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3\*-[CH3]

14. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der bispezifische Antikörper aus einem heterologen Ratte/Maus bispezifischen Antikörper ausgewählt wird.
15. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der trispezifische Antikörper einen T-Zell-Bindungsarm, einen Zielzell-Bindungsarm und eine dritte Spezifität zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen besitzt.
16. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der trispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß

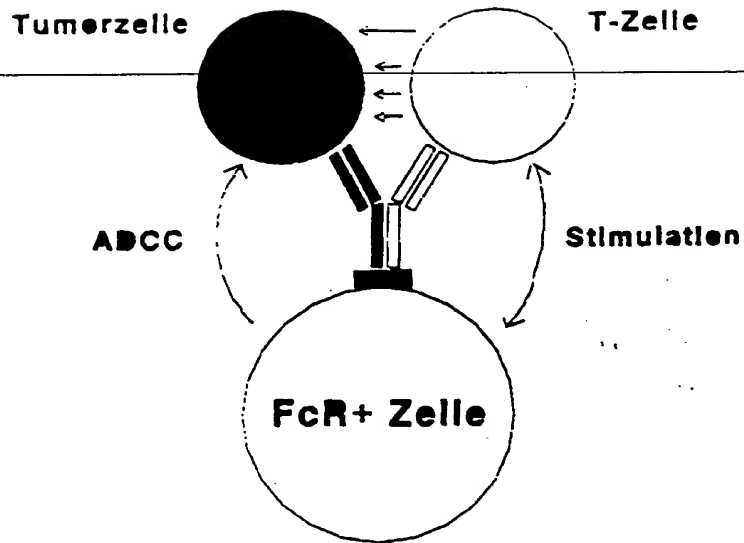
er ein anti-CD3 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-operationell induzierbares Zielzell-assoziiertes Antigen-Antikörper, bevorzugt mit einem zusätzlichen Anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm, ist.

17. Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine Tumorzelle oder eine durch Mikroorganismen infizierte Zelle ist.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehreren der Antikörper nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wahlweise zusammen mit einem oder mehreren üblichen pharmazeutischen Träger- und/oder Hilfsstoffen, in einer therapeutisch wirksamen Menge enthält.
19. Verwendung eines Antikörpers nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Induktion einer Immunantwort und/oder zur Zerstörung der Zielzelle.
20. Verwendung eines Antikörpers nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Prophylaxe und Therapie von

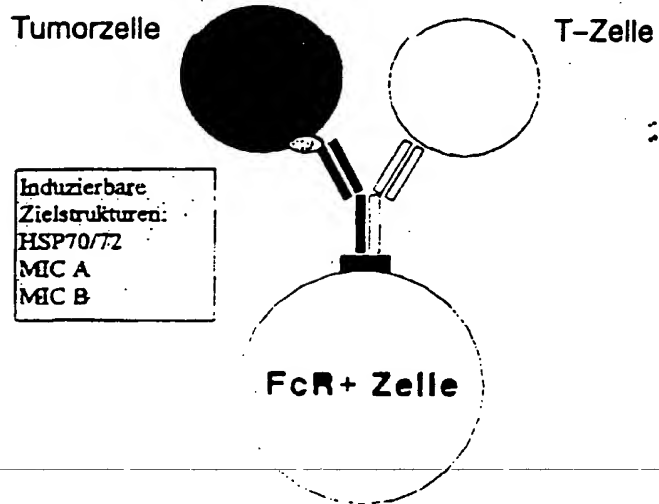
Tumorerkrankungen und von Erkrankungen, die durch Infektion mit Mikroorganismen induziert wurden.

21. Verwendung eines Antikörpers nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Induktion einer Zielzellimmunität, bevorzugt einer Langzeit-Zielzellimmunität.
22. Verwendung eines Antikörpers nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Verminderung der Anzahl kontaminierender Zielzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo, wobei der Antikörper für einen ausreichend langen Zeitraum mit aus Transplantaten gewonnenen Stammzellen, die kontaminierende Zielzellen enthalten können, in Kontakt gebracht wird, um die Anzahl an kontaminierenden Zielzellen im Stammzelltransplantat zumindest zu verringern.
23. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Zielzelle eine Tumorzelle oder eine durch Mikroorganismen infizierte Zelle eingesetzt wird.

Abb. 1 A + B



A



B

Abb. 2

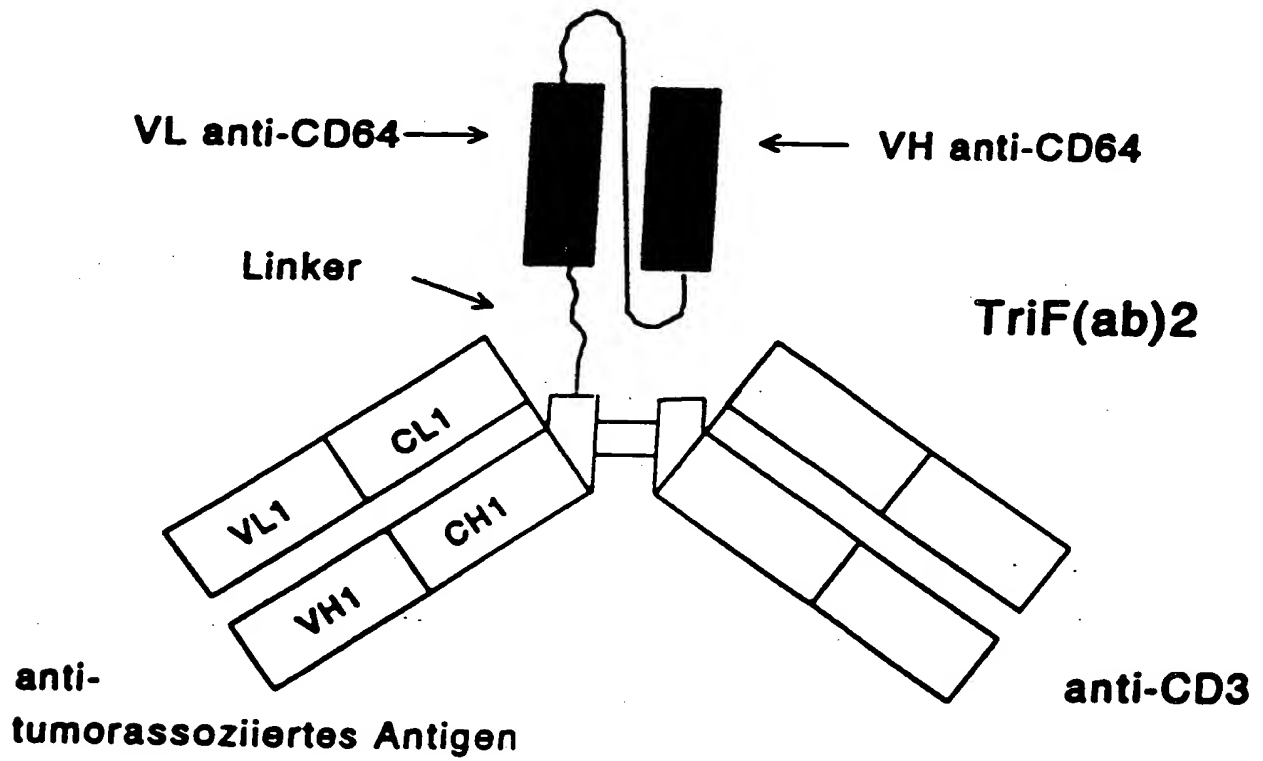


Abb. 3

